

На правах рукописи

Антонова

Антонова Екатерина Петровна

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ У ПРИРОДНО-
АДАПТИРОВАННЫХ К ГИПОКСИИ-РЕОКСИГЕНАЦИИ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии Карельского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент

Илюха Виктор Александрович

Официальные оппоненты: **Архипенко Юрий Владимирович**

доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», лаборатория адаптационной медицины факультета фундаментальной медицины, заведующий лабораторией

Тюлькова Екатерина Иосифовна

доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, лаборатория регуляции функций нейронов мозга, старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «6» июля 2016 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 004.017.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 167982, Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50, nivarlam@physiol.komisc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук и на сайте: <http://physiol.komisc.ru>.

Автореферат разослан «___» мая 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Варламова Нина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. По современным представлениям, наиболее опасными, в плане увеличения продукции активных форм кислорода (АФК), являются часто встречающиеся в природе состояния гипоксии и реоксигенации (Allan, Storey, 2012; Welker et al., 2013). Как дефицит кислорода (Hindle et al., 2009), так и его повышенное потребление непосредственно после ныряния (Cantu-Medellin et al., 2011) и при выходе из спячки (Breukelen, Martin, 2002) могут приводить к усиленной генерации АФК, разбалансировке между образованием кислородных радикалов и антиоксидантной системой. Одним из способов поддержания на стационарном уровне АФК и предотвращения окислительных повреждений является повышение активности антиоксидантных ферментов (АОФ) – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Природно-адаптированные к дефициту кислорода животные (зимоспящие, ныряющие, подземно-роющие млекопитающие) могут служить удобной моделью для изучения этих процессов (Hochachka, Somero, 2002; Wihelm Filho et al., 2007; Allan, Storey, 2012; Welker et al., 2013; Hermes-Lima et al., 2015). Гибернация является энергосберегающим состоянием, при котором происходит значительное снижение температуры тела (до $+2^{\circ}\text{C}$), позволяющее гетеротермным млекопитающим выживать в неблагоприятных условиях среды (Drew et al., 2007; Storey, Storey, 2010; Dave et al., 2012). Ныряние мелких млекопитающих также сопровождается небольшим снижением температуры тела (до 30°C) (MacArthur, 1984; McCulloch, 2012). К настоящему времени выявлено, что по сравнению с другими видами, животные, периодически подвергающиеся гипоксии-реоксигенации, обладают определённым набором биохимических и физиологических адаптаций для поддержания кислородного гомеостаза. Так, у ныряющих млекопитающих отмечается высокое сродство гемоглобина к кислороду, большие запасы кислорода в организме, высокая активность гликолитических ферментов (Галанцев, 1977; Messelt, Blix, 1974; Wihelm Filho et al., 2002; Zenteno-Savin et al., 2002; Reishl et al., 2007). У сусликов при гибернации наблюдается увеличение содержания одного из низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбата в плазме крови и спинномозговой жидкости (Drew et al., 2002; Drew et al., 2004) и снижение энзиматической активности (Breukelen, Martin, 2002). Вместе с тем такие исследования выполнены в основном на крупных морских млекопитающих и сусликах, в то время как сведения об адаптациях полуводных ныряльщиков, мелких зимоспящих и подземно-роющих животных, также испытывающих гипоксию-реоксигенацию, крайне малочисленны и фрагментарны.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось исследование активности антиоксидантных ферментов у природно-адаптированных и не подвергающихся гипоксии-реоксигенации млекопитающих, принадлежащих к разным систематическим группам.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать активность СОД и каталазы у насекомоядных, грызунов и рукокрылых.
2. Провести сравнительную оценку участия АОФ в механизмах физиологических адаптаций к периодической гипоксии у впадающих в спячку, ныряющих и подземно-роющих видов млекопитающих.
3. Исследовать сезонные изменения активности СОД и каталазы у летучих мышей во время гибернации.
4. Изучить динамику становления ферментативного звена антиоксидантной системы в онтогенезе у ныряющих и сухопутных видов млекопитающих.

Научная новизна исследования.

Впервые обнаружено, что по сравнению с незимоспящими видами млекопитающих у летучих мышей в начале гибернационного периода (ноябрь) активность каталазы в сердце и СОД в скелетной мышце выше, при этом к середине спячки (февраль-март) активность каталазы снижалась, а активность СОД повышалась.

Впервые показано, что подвергающиеся периодической гипоксии-реоксигенации полуводные грызуны имеют повышенные уровни активности СОД и каталазы в печени, почках и сердце по сравнению с неадаптированными животными (крысой). Максимальное количество различий в активности АОФ между ныряющими и наземными грызунами выявлено в наиболее чувствительных к смене кислородных условий тканях сердца. Впервые продемонстрировано, что становление дефинитивного профиля АОФ в онтогенезе у полуводных грызунов происходит раньше, чем у сухопутных. Подземно-роющий крот отличался более высокой активностью АОФ в тканях по сравнению с животными той же систематической группы (насекомоядные).

Научно-практическая значимость работы.

Полученные данные об участии АОФ в адаптациях гибернирующих, полуводных и подземно-роющих млекопитающих расширяют и углубляют существующие представления о механизмах и стратегиях адаптаций к условиям гипоксии-реоксигенации, а также способствуют пониманию механизмов естественного предотвращения их патологических последствий, в частности окислительных повреждений. Адаптация организма к экстремальным факторам, в частности к недостатку кислорода, представ-

ляет интерес как научная проблема с возможными практическими выходами в медицину.

Результаты работы используются при чтении лекционных курсов по экологической физиологии и биохимии в Петрозаводском государственном университете.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Антиоксидантные ферменты участвуют в адаптациях природно-адаптированных к гипоксии-реоксигенации млекопитающих.

2. Повышенная активность АОФ в сердечной (каталазы) и скелетной мышце (СОД) у летучих мышей, по сравнению с сопоставимыми по массе незимоспящими видами млекопитающих, обеспечивает антиоксидантную защиту при периодических пробуждениях.

3. Полуводные и подземно-роющие животные имеют в тканях органов повышенную активность СОД или каталазы по сравнению с наземными животными той же систематической группы.

4. Становление дефинитивного профиля АОФ в онтогенезе у полуводных видов грызунов происходит раньше, чем у сухопутных.

Апробация диссертации. Основные результаты работы были представлены на всероссийских, региональных и международных конференциях: 14 и 16-я Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010, 2012); XXII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013); VI Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2014» (Москва, 2014); 9th Baltic Theriological Conference (Daugavpils, Latvia, 2014); IX Международная конференция «Биоантиоксидант», (Москва, 2015). Диссертационная работа апробирована на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор лично выполнял методики и обобщал полученные данные. Выводы сделаны на основе собственных оригинальных данных. В разных совместных публикациях вклад автора составил от 60 до 95%.

Легитимность исследования. Протоколы экспериментов одобрены независимым локальным комитетом по биоэтике Института биологии КарНЦ РАН (протокол № 11 от 22.11.2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 25 работ, включающие 8 статей, из которых 5 в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы исследования вошли в зарегистрированную базу данных «Со-

стояние антиоксидантной системы млекопитающих различного экогенеза при влиянии факторов среды» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013621172, от 17 сентября 2013 г.).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 12 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 разделов результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 246 наименований, из них 201 иностранных.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему учителю и наставнику – научному руководителю д.б.н. Виктору Александровичу Илюхе за всестороннюю поддержку в проведении исследования, а также всем сотрудникам лаборатории экологической физиологии животных ИБ КарНЦ РАН, в частности к.б.н. С.Н. Сергиной, к.б.н. Л.Б. Узенбаевой и к.б.н. Е.А. Хижкину за ценные научные советы. Особая благодарность сотрудникам лаборатории зоологии ИБ КарНЦ РАН за помощь в отлове животных в природе – к.б.н. А.Е. Якимовой и к.б.н. В.В. Белкину.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента НШ-1642.2012.4, НШ-1410.2014.4 (Руководитель д.б.н., член-корр. РАН Н.Н. Немова), ФЦП ГК № 02.740.11.0700 и ФЦП ГК № 8050, федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ 0221-2014-0001). Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Первая глава диссертации является обзором литературы по рассматриваемой проблеме и состоит из разделов, содержащих сведения об антиоксидантной системе, участии ее в адаптациях гибернирующих, ныряющих и поземно-роющих видов млекопитающих, а также приводится характеристика эколого-физиологических особенностей мелких млекопитающих различных систематических групп. Каждый раздел заканчивается кратким заключением, о современном состоянии исследованности проблемы и оставшихся неизученными аспектах.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись рукокрылые (Chiroptera), грызуны (Rodentia) и насекомоядные (Insectivora) (Таблица 1).

Таблица 1.

Общая характеристика и количество использованных экспериментальных животных

Отряд	Вид	Возраст*, количество	Время отбора образцов	Жизненная форма
Рукокрылые (Chiroptera)	Северный кожанок (<i>Eptesicus nilssonii</i> Keyserling, Blasius)	Ad, n=4	ноябрь	зимоспящие
		Juv, n=2, Ad, n=6	февраль-март	
	Ночница Брандта (<i>Myotis brandtii</i> Eversmann)	Ad, n=2	ноябрь	зимоспящие
		Ad, n=5	февраль-март	
	Бурый ушан (<i>Plecotus auritus</i> L.)	Ad, n=1	ноябрь	зимоспящие
		Ad, n=3	февраль-март	
	Водяная ночница (<i>Myotis daubentonii</i> Kuhl)	Ad, n=3	ноябрь	зимоспящие
		Ad, n=2	февраль-март	
Грызуны (Rodentia)	Крыса лабораторная (<i>Rattus norvegicus</i> Berk.)	6 мес., n=5	октябрь	наземные
		18 мес., n=5		
	Водяная полевка (<i>Arvicola terrestris</i> L.)	Juv, n=10	август-сентябрь	полуводные
		Ad, n=14		
	Ондатра (<i>Ondatra zibethicus</i> L.)	Juv (5-6 мес.), n=11	октябрь	полуводные
		Ad (>12 мес), n=12		
	Европейский бобр (<i>Castor fiber</i> L.)	Ad (>3 лет), n=12	октябрь	полуводные
Насекомоядные (Insectivora)	Обыкновенная бурозубка (<i>Sorex araneus</i> L.)	Juv, n=8	август-сентябрь	норные
		Ad, n=6		
	Водяная кутора (<i>Neomys fodiens</i> Pennant.)	Juv, n=22		полуводные
		Ad, n=13		
	Обыкновенный крот (<i>Talpa europaea</i> L.)	Ad, n=8		подземно-роющие

Примечание: Juv – неполовозрелые особи, Ad – половозрелые особи.

Лабораторные крысы Вистар содержались в стандартных помещениях вивария ПетрГУ площадью 25 м² в клетках размером 44x25x62 см при температуре 22±2°C. Изъятие летучих мышей проводили в начале зимней спячки (ноябрь) и в период глубокой спячки (февраль-март). Выборочный сбор летучих мышей проведен на зимовках в Республике Карелия (п. Рускеала и п. Колатсельга) по Разрешениям Управления охотничьего хозяйства РК (№№ 0002-2010, 0001-2011, 00008-2013). Отловленных рукокрылых помещали в холод (-4 °C) на сутки, после производили декапитацию и отбор образцов у спящих животных. Самцы и самки ондатр (n=23) были отловлены в осенний период (15.10–17.10.2011 г.) на оз. Миккельское в окрестностях п. Эссоила (Карелия). Остальные животные отловлены в природе на Каскеснаволоцком стационаре Института биологии КарНЦ РАН в 2010 – 2015 гг. Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/EC), «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Биоэтических правил проведения исследований на человеке и животных».

Методы исследования. Образцы тканей печени, почек, сердца, легких и скелетной мышцы исследованных животных отбирали после декапитации, замораживали и хранили до проведения анализа при -25°C. Для определения активности антиоксидантных ферментов гомогенаты тканей готовили в 0,05 М фосфатном буферном растворе (pH=7,0), после чего центрифугировали при 6000g в течение 15 мин. Активность АОФ определяли спектрофотометрически: СОД – по модифицированной адrenoхромной методике (Misra, Fridovich, 1972), каталазы – по количеству разложенной перекиси водорода (Bears, Sizer, 1952). Содержание белка определяли по методу Лоури (Lowry, 1951). За 1 усл. ед. активности СОД принимали количество фермента, способное затормозить реакцию автоокисления адреналина на 50%. Активность каталазы выражали в мкмоль Н₂O₂, разложенной за 1 минуту. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сырой ткани и на 1 мг белка.

Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов статистических программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики. Сравнение проводили используя непараметрический критерий (U) Вилкоксона-Манна-Уитни и кластерный анализ (метод ближайшего соседа). Для оценки степени влияния факторов использовали дисперсионный анализ. В настоящем исследовании не было выявлено достоверных половых различий по изученным показателям, поэтому результаты для обоих полов были объединены.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активность антиоксидантных ферментов у гибернирующих летучих мышей

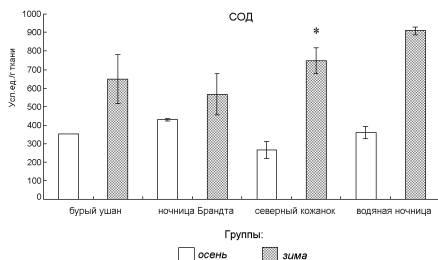


Рис. 1. Активность СОД в печени летучих мышей в начале гибернации (осень) и во время глубокой спячки (зима) ($M \pm m$). Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с животными отловленными осенью у одного вида ($p < 0,05$).

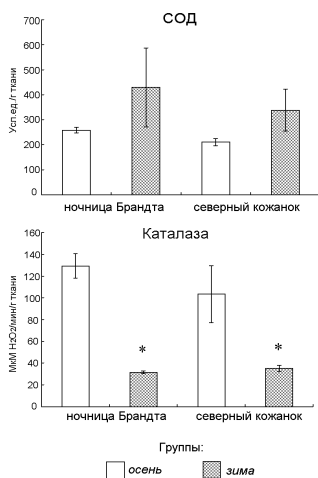


Рис. 2. Активность АОФ в сердце летучих мышей в начале гибернации (осень) и во время глубокой спячки (зима) ($M \pm m$). Условные обозначения: как на рисунке. 1.

В органах изученных видов рукокрылых обнаружена ткане- и видоспецифичность активности АОФ. В печени у всех исследованных видов выявлено увеличение активности СОД в зимний период при сравнении с особями отловленными осенью (начало гибернации) (Рис. 1), для северного кожанка эти изменения были значимыми. Максимальная активность АОФ в печени выявлена у водяной ночницы.

Анализ ферментативного звена антиоксидантной защиты в сердце и почках показал, что у летучих мышей находящихся в более глубокой спячке (февраль) активность каталазы в изученных органах была ниже, чем у особей, отловленных в начале гибернации (ноябрь) – для сердца снижение активности каталазы составляло у ночницы Брандта 75,6%, а у северного кожанка 65,7% (Рис. 2), для почек 57,1% и 26,6% соответственно. Необходимо отметить, что уровень активности каталазы в сердце и СОД в скелетных мышцах летучих мышей (отловленных осенью) был зна-

чительно выше при сравнении с сопоставимыми по массе незимоспящими видами млекопитающих (бурозубка и кутора).

Активность антиоксидантных ферментов у млекопитающих (Rodentia, Insectivora) различного экогенеза

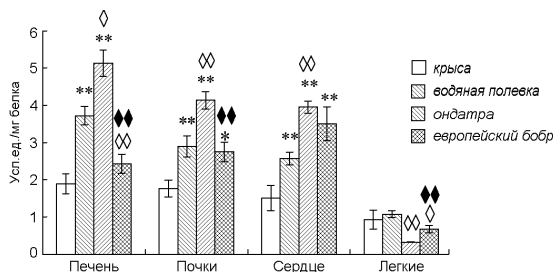


Рис. 3. Удельная активность СОД у грызунов различного экогенеза ($M \pm m$). Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с крысой; ◇ – различия достоверны по сравнению с водяной полевкой; ♦ – различия достоверны по сравнению с ондатрой; *, ◇, ♦ $p < 0.05$; **, ◇♦, ♦♦ $p < 0.01$ (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Изучение ферментов системы антиоксидантной защиты выявило ряд отличий ныряющих от ныряющих видов млекопитающих (Рис. 3). Было обнаружено, что у полуводных грызунов (водяная полевка, ондатра, европейский бобр) уровень удельной активности СОД выше в печени,

почках и сердце по сравнению с лабораторной крысой, а максимальная активность СОД в этих органах наблюдалась у ондатры (Рис. 3).

В результате исследования было выявлено, что удельная активность каталазы, также была выше у полуводных грызунов почти во всех органах по сравнению с крысой, за исключением печени и сердца водяной полевки (Рис. 4). В печени, почках, сердце и скелетной мышце максимальная удельная активность каталазы выявлена у бобра (Рис. 4).

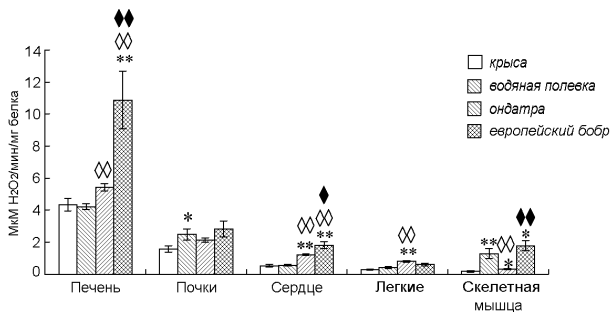


Рис. 4. Удельная активность каталазы у грызунов различного экогенеза ($M \pm m$). Условные обозначения: как на рисунке 3.

В отличие от грызунов у представителей насекомоядных удельная активность каталазы была достоверно выше у обыкновенной бурозубки по сравнению с полуводной кутурой в печени, почках и сердце (Рис. 5).

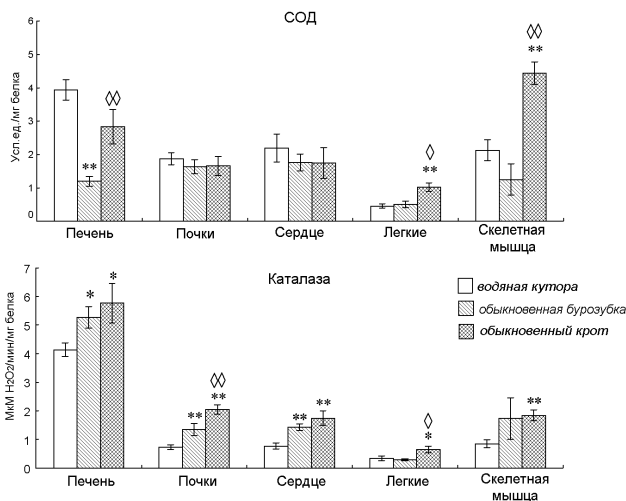


Рис. 5. Удельные активности АОФ в органах и тканях насекомоядных ($M \pm m$). Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с водяной кутурой; \diamond – различия достоверны по сравнению с бурозубкой; *, \diamond – $p < 0.05$; **, \diamond – $p < 0.01$ (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Однако удельная активность СОД в органах водяной кутуры, за исключением легких, была выше (для печени достоверно), чем у бурозубки.

Максимальная активность каталазы в печени, почках, сердце и легких была обнаружена нами у обыкновенного крота (Рис. 5), при этом в скелетных мышцах активность СОД была выше, чем в печени.

Возрастные изменения активности антиоксидантных ферментов у полуводных и сухопутных насекомоядных и грызунов

В результате исследования возрастных изменений активности АОФ у полуводных и наземных грызунов были выявлены видо- и тканеспецифичные особенности становления системы. Так, например, в печени исследованных видов грызунов не выявлено достоверных возрастных изменений активности АОФ. В почках и сердце лабораторной крысы наблюдалось «рассогласование» системы ферментов – увеличение активности каталазы и снижение активности СОД с возрастом, в то время как у

полуводных видов (ондатра и водяная полевка) в этих органах не обнаружено достоверных изменений активности АОФ. Максимальное количество возрастных различий активности ферментов у исследованных видов грызунов выявлено в скелетной мышце (Рис. 6).

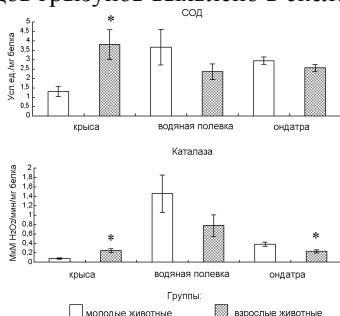


Рис. 6. Возрастные изменения удельной активности АОФ в скелетных мышцах у грызунов ($M \pm m$).
Условные обозначения: * – различия достоверны по сравнению с молодыми животными одного вида ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

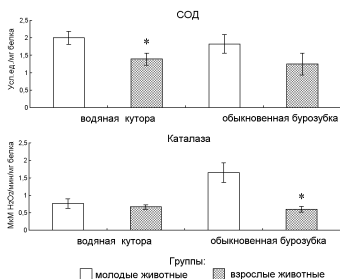


Рис. 7. Возрастные изменения удельной активности АОФ в почках насекомоядных ($M \pm m$).
Условные обозначения: как на рисунке 6.

Изменения исследованных показателей были выражены в меньшей степени, по сравнению с насекомоядными. Очевидно, дефинитивный уровень активности АОФ у ныряющих грызунов формируется на более ранних стадиях онтогенеза и поддерживается затем на определенном уровне, обеспечивая необходимую защиту органов во время гипоксии-реоксигенации.

Так, у ныряющих видов (ондатра и водяная полевка) в скелетных мышцах активность СОД и каталазы с возрастом снижается (для ондатры достоверно снижалась только активность каталазы). Напротив у молодых крыс (не адаптированные к гипоксии-реоксигенации) была обнаружена достоверно более низкая активность АОФ по сравнению со взрослыми животными (Рис. 6).

В отличие от грызунов, у насекомоядных в печени достоверные возрастные различия выявлены только у бурозубки – активность каталазы у молодых животных была ниже, чем у взрослых особей. В почках насекомоядных обнаружено снижение активности АОФ с возрастом (Рис. 7). По сравнению с бурозубкой, у которой не наблюдалось достоверных возрастных изменений активности АОФ (легкие, сердце), у водяной куторы выявлено увеличение активности СОД в легких, сердце и скелетной ткани.

Таким образом, у полуводных грызунов возрастные изменения

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В главе на основании результатов собственных исследований и оценки данных литературы рассматриваются стратегии и механизмы адаптаций к гипоксии-реоксигенации у млекопитающих различных систематических и экологических групп.

Активность антиоксидантных ферментов у летучих мышей во время гибернации

В результате исследования была выявлена ткане- и видоспецифичность активности антиоксидантных ферментов в органах изученных видов летучих мышей. В печени у всех исследованных видов рукокрылых выявлено увеличение активности СОД в зимний период при сравнении с особями, отловленными в начале гибернации. Скорее всего, выявленное в нашем исследовании увеличение активности СОД не связано с синтезом фермента *de novo*. Имеющиеся данные в экспериментах на сусликах свидетельствуют об отсутствии различий в экспрессии генов СОД между активными и гибернирующими животными (Page, 2009). Вполне вероятно, что одним из механизмов повышения активности СОД в ходе гибернации может быть восстановление тиоловой группы фермента под действием SH-содержащих соединений или фосфорилирование и дефосфорилирование молекулы фермента (MacDonald, Storey, 1999; Storey, 2015).

Анализ активности антиоксидантных ферментов в сердце и почках показал, что у летучих мышей, отловленных в феврале-марте, активность каталазы в изученных органах была ниже, чем у особей, отловленных в начале гибернации. Исходя из теории «преадаптации к окислительному стрессу» (Hermes-Lima et al., 1998; Welker et al., 2013), на начальных стадиях гипоксии происходит увеличение продукции АФК несмотря на снижение концентрации O_2 . Возможно, обнаруженный в нашем исследовании высокий уровень активности каталазы в сердце и СОД в скелетных мышцах летучих мышей в начале гибернации (по сравнению с незимоспящими видами) необходим для защиты от АФК. Аналогичные результаты были получены на сусликах (Астаева, Кличханов, 2009), для которых было показано, что активность каталазы в крови перед впадением в спячку увеличивается. Кратковременная гибернация у сусликов приводила к снижению активности каталазы, что могло быть связано, как с угнетением синтеза фермента, так и функциональным «выключением» в результате его фосфорилирования (Астаева, Кличханов, 2009; Storey, 2015). Такая стратегия регуляции позволяет клеткам быстро реагировать на стремительно меняющиеся потребности организма при пробуждении.

Активность антиоксидантных ферментов у полуводных, подземно-роющих и сухопутных насекомоядных и грызунов

Переход млекопитающих из наземной среды обитания в водную, сопровождается многочисленными морфологическими, физиологическими и биохимическими компенсаторными изменениями (Слоним, 1971; Галанцев и др., 1994; MacArthur et al., 2001; Hochachka, Somero, 2002; Noren et al., 2008). Практически неизученными остаются адаптации полуводных млекопитающих, которые считаются современными аналогами эволюционных промежуточных форм между предковыми наземными видами и их потомками, ведущими полностью водный образ жизни (Fish, Baudinette, 1999). В нашем исследовании было обнаружено, что у полуводных грызунов (водяная полевка, ондатра, европейский бобр) уровень удельной активности СОД выше в печени, почках и сердце по сравнению с лабораторной крысой (Рис. 3). Очевидно, что выявленный нами повышенный уровень удельной активности СОД является следствием усиленного образования $O_2^{\cdot -}$, поскольку активность фермента изменяется в зависимости от концентрации своего субстрата. Проведенные J. P. Zenteno-Savin и коллегами исследования (2002) показали, что генерация супероксидного анион-радикала выше в органах кольчатой нерпы, чем в сердце, почках и скелетных мышцах свиньи.

В результате исследования было выявлено, что удельная активность каталазы, ускоряющей реакцию двухэлектронного восстановления H_2O_2 , играющей важную роль в развитии адаптивных реакций клетки в ответ на окислительный стресс, также была выше у полуводных грызунов почти во всех органах по сравнению с крысой, за исключением печени и сердца водяной полевки (Рис. 4). Аналогичные результаты для ондатры были получены В. П. Галанцевым и коллегами (Галанцев и др., 1993; 1994). Авторами было показано, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) в сердце у крыс имеет тенденцию к усилению при брадикардии, вызванной задержкой дыхания, а у ондатры, наоборот, ПОЛ уменьшалось на 30%, активность каталазы при этом у последних увеличивалась почти в 2 раза.

В печени, почках, сердце и скелетной мышце максимальная удельная активность каталазы выявлена у бобра (Рис. 4). Наблюдаемые повышенные уровни данного показателя в печени бобра и легких ондатры, при относительно низкой активности СОД, говорят о наличии других источников перекиси водорода. Перекись водорода, наиболее стабильная молекула из всех АФК, хорошо растворима в воде и легко проходит сквозь мембраны и может участвовать в механизмах сигналинга, приводя к активации антиоксидантных генов (Cantú-Medellín et al., 2011).

Удельная активность каталазы у представителей насекомоядных была достоверно выше у обыкновенной бурозубки по сравнению с полуводной куторой в печени, почках и сердце (Рис. 5), при этом удельная активность СОД в органах водяной куторы, за исключением легких, была выше (для печени достоверно), чем у бурозубки. В литературе встречается мало сведений, характеризующих антиоксидантную систему насекомоядных. В работах A.G. Hindle и соавторов (2009, 2010) на двух симпатрических видах землероек было показано, что в скелетной мышце активность каталазы оказалась выше в 2 раза у ныряющей болотной бурозубки (*Sorex palustris*), однако активность глутатионпероксидазы была в три раза выше у короткохвостой землеройки (*Blarina brevicauda*), уровень СОД при этом был соизмерим у двух видов. Кроме того, авторами было зарегистрировано, что в мышцах у болотной бурозубки содержание маркеров окислительного стресса было ниже, чем у наземной короткохвостой бурозубки, что могло быть связано с повышенным содержанием миоглобина в мышцах болотной бурозубки по сравнению с короткохвостой землеройкой (Gusztak, 2008; Stewart et al., 2005). Помимо того, что миоглобин участвует в запасании кислорода, он обладает прямыми антиоксидантными свойствами (Flögel et al., 2004).

Максимальная активность каталазы в печени, почках, сердце и легких была обнаружена нами у обыкновенного крота (Рис. 5), при этом в скелетных мышцах активность СОД была выше, чем в печени. Данные факты свидетельствуют об усиленном образовании АФК ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2) и вероятном увеличении окислительных повреждений. Ранее проведенные исследования (Andziak et al., 2006; Hindle et al., 2010) показали, что содержание маркеров окислительного стресса и уровень ПОЛ, как у землероек, так и у голого землекопа (*Heterocephalus glaber*), были значительно выше по сравнению с лабораторными крысой и мышью, соответственно.

Онтогенетические изменения антиоксидантной защиты тканей у насекомоядных и грызунов

Выявление основных закономерностей онтогенеза животных различных экологических и филогенетических групп необходимо для понимания становления механизмов адаптации и оценки скорости формирования приспособительных реакций. В результате исследования было обнаружено, что становление ферментативного компонента антиоксидантной системы у полуводных грызунов (ондатра, водяная полевка) формируется на более ранних стадиях онтогенеза, чем у насекомоядных (бурозубка, кутора), обеспечивая необходимую защиту органов во время ныряния.

Образование кислородных радикалов увеличивается с возрастом

(Bejma, Ji, 1999). Однако было показано возрастное увеличение содержания только одного маркера окислительного стресса в скелетных мышцах землероек (Hindle et al., 2010), что указывает на увеличение антиоксидантной защиты в онтогенезе. В нашем исследовании у куторы выявлено увеличение активности СОД в сердечной и скелетной тканях по сравнению с бурозубкой, у которой не наблюдалось достоверных возрастных изменений активности АОФ. Полученные результаты частично согласуются с имеющимися в литературе сведениями. В исследовании Hindle и соавторов (2010) было обнаружено увеличение с возрастом активности каталазы и глутатионпероксидазы в мышцах, как у ныряющей болотной бурозубки, так и у короткохвостой землеройки. Аналогично, активность Cu, Zn-СОД была значительно выше у половозрелых особей обоих видов.

Влияние различных факторов на активность антиоксидантных ферментов у млекопитающих

В природе животные сталкиваются не с одним, а с целым рядом воздействующих на них факторов (Шмидт-Нильсен, 1982; Хочачка, Сомеро, 1988). В то же время их влияние может приводить к однонаправленным изменениям со стороны ферментативных систем. В рассматриваемой нами группе представлены млекопитающие, различающиеся как по систематической принадлежности, так и по особенностям экологии. Часть из них в той или иной степени испытывают гипоксию. Полуводные виды – бобр, ондатра, водяная полевка и кутора – испытывают функциональную нагрузку на организм, связанную с дефицитом кислорода при нырянии, а бурозубка и крот – в связи с обитанием в норах.

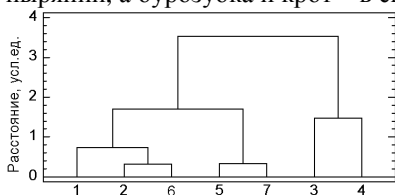


Рис. 8. Дендрограмма, иллюстрирующая дистанции между видам млекопитающих по показателям активности СОД и каталазы в сердце (метод ближайшего соседа).

Условные обозначения: 1 – крыса, 2 – водяная полевка, 3 – ондатра, 4 – европейский бобр, 5 – обыкновенная бурозубка, 6 – водяная кутора, 7 – обыкновенный крот.

Кластерный анализ активности СОД и каталазы в сердце выявил наибольшее сходство водяной полевки и куторы (полуводные), и бурозубки и крота (насекомоядные) (Рис. 8). Более крупные ныряльщики – ондатра и бобр, также образовали кластер. В нашем исследовании показано, что ондатра отличается повышенным уровнем активности СОД, а у бобра выявлена максимальная активность каталазы в органах. По данным литературы продолжительность ныряния у бобра составляет до 15

мин (Graf, 2012), у ондатры до 12 мин (Scholander, 1940), но энергетическая стоимость перемещения ондатры в воде равняется 2.18 Дж/Нм, по сравнению с канадским бобротом (*C. canadensis*) – 0.36 Дж/Нм (Fish, 2000).

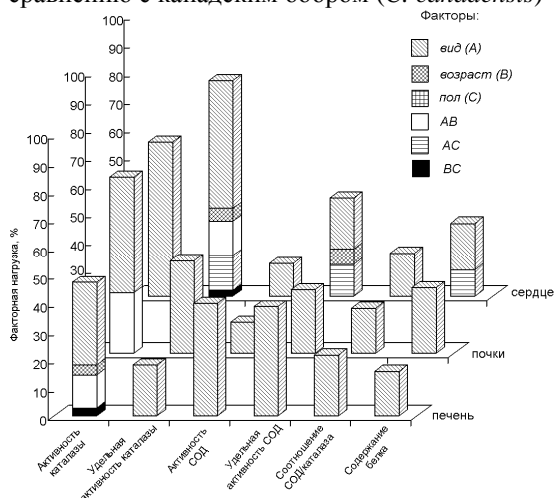


Рис. 9. Влияние различных факторов на активность АОФ, соотношение СОД/каталаза и содержание белка в органах млекопитающих (ондатра, водяная полевка, водяная кутора, крыса, обыкновенная бурозубка) (по данным дисперсионного анализа).

Дисперсионный анализ активности ферментов и содержания белка у исследованных видов показал, что изученные нами факторы (вид животных, пол и возраст) объясняют до 80% дисперсии изученных показателей (Рис. 9). При этом на активность каталазы их влияние выше, чем на активность СОД. Для сердца обнаружено максимальное влияние фактора «возраст», как отдельно, так и совместно с другими факторами.

Энергетический обмен у животных в течение года не постоянен. Особый интерес представляют зимоспящие млекопитающие, так как они способны существенно изменять температуру тела не только в различные сезоны года, но и в период гибернации. В результате проведенного нами дисперсионного анализа активности АОФ и содержания белка у исследованных видов рукокрылых было показано, что изученные факторы (пол животного, сезон отлова и видовая принадлежность) оказывают наибольшее влияние на активность каталазы. При этом в сердце было обнаружено максимальное влияние «сезона» (69,9%). Наблюдаемые сезонные изменения активностей АОФ вероятно необходимы для обеспечения высокой эффективности функционирования метаболических систем в условиях вхождения в гипометаболическое состояние, собственно гибернации и при периодических пробуждениях.

ВЫВОДЫ

1. Установлено участие АОФ в адаптивных реакциях к гипоксии-реоксигенации у гибернирующих, ныряющих и подземно-роющих млекопитающих.
2. По сравнению с сопоставимыми по массе незимоспящими видами млекопитающих летучие мыши характеризуются повышенной активностью СОД в скелетной мышце, что вероятно вносит вклад в устойчивость гибернантов к мышечной атрофии.
3. Снижение активности каталазы и увеличение активности СОД в ходе гибернации в тканях летучих мышей является одним из физиологических механизмов приспособления к периодической гипоксии-реоксигенации.
4. Показано, что у полуводных грызунов активность АОФ в органах (печень, почки, сердце) была выше, чем у наземной крысы. Обнаруженная у полуводных грызунов видоспецифичность связанных с нырянием изменений АОФ (повышенная активность СОД в тканях органов ондатры и каталазы у бобра) является отражением экологической специализации этих видов.
5. Среди исследованных видов насекомоядных наиболее высокий уровень активности СОД (легкие и скелетная мышца) и каталазы (печени, почки, сердце и легкие) отмечался у подземно-роющего крота, что связано с обитанием в среде с дефицитом кислорода и повышенным содержанием углекислого газа.
6. Возрастные изменения исследованных показателей у полуводных грызунов были выражены в меньшей степени, чем у насекомоядных. Очевидно, дефинитивный уровень активности АОФ у ныряльщиков формируется на более ранних стадиях онтогенеза.
7. Из всех исследованных органов антиоксидантная защита сердца оказалась наиболее чувствительной к действию онтогенетического (насекомоядные, грызуны) и сезонного (рукокрылые) факторов.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка ВАК РФ

1. **Антонова Е.П.**, Илюха В.А., Белкин В.В., Хижкин Е.А., Сергина С.Н., Ильина Т.Н., Якимова А.Е. Энергообеспечение и антиоксидантная защита летучих мышей в период зимней спячки // Ученые

записки Орловского государственного университета. 2014. №7(63). С. 235–236.

2. Илюха В.А., **Антонова Е.П.**, Хижкин Е.А., Узенбаева Л.Б., Ильина Т.Н., Баишникова И.В., Белкин В.В., Шведов Д.В., Черкисова К.В. Физиолого-биохимические адаптации ондатры к полуводному образу жизни // Вестник охотоведения. 2014. Т. 11. №2. С. 231–234.
3. Sergina S., **Antonova E.**, Pyukha V., Łapiński S., Lis M., Niedbała P., Unzhakov A., Belkin V. Biochemical adaptations to dive-derived hypoxia/reoxygenation in semiaquatic rodents // Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 2015. Vol. 190. P. 37–45.
4. **Антонова Е.П.**, Илюха В.А., Сергина С.Н., Хижкин Е.А., Белкин В.В., Якимова А.Е. Зимняя спячка как адаптивный механизм в условиях Севера // Вестник СВФУ. 2015. № 6 (50). С. 5–13.
5. Хижкин Е.А., **Антонова Е.П.**, Илюха В.А., Узенбаева Л.Б., Ильина Т.Н., Баишникова И.В., Белкин В.В., Шведов Д.В. Возрастные изменения физиолого-биохимических показателей у грызунов с различной экологической специализацией // Труды Карельского научного центра. 2015. № 11. С. 3–21.

Статьи в иных изданиях

1. **Антонова Е.П.**, Хижкин Е.А., Якимова А.Е., Илюха В.А. Антиоксидантные ферменты у природно-адаптированных к дефициту кислорода млекопитающих // Принципы экологии. 2013. Т. 2. № 1. С. 21–32.
2. **Антонова Е.П.**, Илюха В.А., Сергина С.Н. Антиоксидантная защита у зимоспящих млекопитающих // Принципы экологии. 2015. № 2. С. 4–22.
3. Pyukha V., **Antonova E.**, Belkin V., Uzenbaeva L., Khizhkin E., Sergina S., Ilyina T., Baishnikova I., Kizhina A., Yakimova A. The eco-physiological status of hibernating bats (Chiroptera) in the north of the European distribution range // Acta Biol. Univ. Daugavp. 2015. Vol. 15 (1). P. 75–94.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АОФ – антиоксидантные ферменты,
АФК – активные формы кислорода,
ПОЛ – перекисное окисление липидов,
СОД – супероксиддисмутаза.